PARIJS

FACULTE DE MEDECINE BROUSSAIS HOTEL DIEU

Année 1973

N° 101

THESE

pour le

DOCTORAT EN MEDECINE

(doctorat d'Etat)

par

Reyda HADDAM

né le 17 Août 1945 à TLEMCEN (Algérie)

présentée et soutenue publiquement le

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA STRUCTURE DES LIPOPROTEINES

Président : Monsieur Paul MILLIEZ, Professeur

F A C U L T E D E M E D E C I N E B R O U S S A I S H O T E L D I E U

Année 1973 N°

T H E S E

pour le

DOCTORAT EN MEDECINE

(doctorat d'Etat)

par

Reyda HADDAM

né le 17 Août 1945 à TLEMCEN (Algérie)

présentée et soutenue publiquement le

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA STRUCTURE DES LIPOPROTEINES

Président : Monsieur Paul MILLIEZ, Professeur

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A mon père

A ma mère

A Monsieur le Professeur P. MILLIEZ envers lequel j'ai contracté une immense dette de reconnaissance. Qu'il trouve ici l'expression de mon profond respect.

A Monsieur le Professeur D. DERVICHIAN, auquel je dois mon initiation à la recherche. Je le prie de croire en mon respectueux attachement.

Je remercie Monsieur le Docteur M. DARY de m'avoir accueilli dans son Service.

Je remercie mes camarades du Service de Microscopie électronique de l'I.B.M. de l'Institut Pasteur.

Je remercie aussi vivement mes amis du Laboratoire de Biophysique de l'Institut Pasteur.

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA STRUCTURE DES LIPOPROTEINES

I - INTRODUCTION

La connaissance de la structure des associations lipoprotéiques est particulièrement intéressante, non seulement parce que les lipoprotéines jouent un rôle fondamental dans le transport des lipides par le sang, mais aussi parce que les membranes biologiques sont constituées précisément par des associations de lipides et de protéines.

C'est donc comme modèle que nous avons choisi les lipoprotéines sériques humaines. De plus, elles représentent de véritables entités physicochimiques stables sous forme de particules, faciles à obtenir par ultracentrifugation. Elles sont faciles à conserver parce qu'elles ne contiennent pas de systèmes enzymatiques intégrés susceptibles de les hydrolyser comme c'est le cas de membranes cellulaires autodégradables.

De plus, leur composition et la proportion de leurs différents constituants (protéines, phospholipides, triglycérides, cholestérol et ses esters) sont bien connues. Mais l'on sait moins bien ce qu'est la structure de ces lipoprotéines à l'échelle moléculaire. La question de savoir comment les lipides et les protéines sont associées dans le sérum de façon à ce que des constituants comme les triglycérides, le cholestérol et ses esters, substances hydrophobes se trouvent dissimulés et dissous en phase aqueuse n'a pas eu de réponse nette. Malgré les nombreux travaux qui tentent d'élucider ce problème d'associations lipoprotéiques, les renseignements directs sur la nature de ces associations et les suggestions qui ont été faites ne sont pas confirmées par des preuves expérimentales précises et directes.

Notre présent travail n'a pas non plus la prétention d'apporter à cette question une réponse basée sur une preuve plus directe.

Notre but est simplement d'explorer la particule lipoprotéique en lui faisant subir une véritable dissection enzymatique, de voir alors, l'accessibilité de ses constituants aux différents enzymes, protéase, phospholipase et lipase, de voir si l'ordre d'attaque intervient, parallèlement de suivre au microscope électronique les modifications morphologiques de ces particules après les différentes actions enzymatiques.

Dans une deuxième partie de ce travail, nous avons cherché à connaître dans quelles mesures l'attaque d'un glycéride ou d'un phospholipide par l'enzyme spécifique correspondante, est influencée par la composition du mélange lipidique ; c'est-à-dire dans quelles mesures, l'addition d'une lécithine à un glycéride influe sur l'attaque de celui-ci par

.../

son enzyme spécifique : la lipase ; de même, dans quelles mesures la présence d'un triglycéride influe sur l'attaque d'une lécithine par la phospholipase spécifique. Il s'agit, en somme, d'étudier un modèle reproduisant partiellement les conditions d'attaque d'une lipoprotéine par différentes enzymes.

Enfin, quelques essais potentiométriques ont été faits sur l'hydrolyse enzymatique des lipoprotéines par les enzymes spécifiques de chacun de ses constituants.

II - GENERALITES

1 - Méthode d'Isolement -

Parmi les méthodes d'Isolement des lipoprotéines la première fut celle de Macheboeuf (1) qui en 1928 parvint à isoler, par précipitation par les sels neutres et en faisant intervenir le pH du milieu, à partir de sérum de cheval, des fractions lipoprotéiques de composition constante contenant environ 40 % de lipides qu'il appela cenapses acidoprécipitables.

D'autres méthodes procèdent par précipitation dans les solvants organiques (Cohn 1950 (2), Oncley 1950-1953 (3 et 4), par des polysaccharides sulfate (Bernfeld (5), Burnstein Samaille (6 et 7), par des polymères neutres type P V P (Burnstein (7).

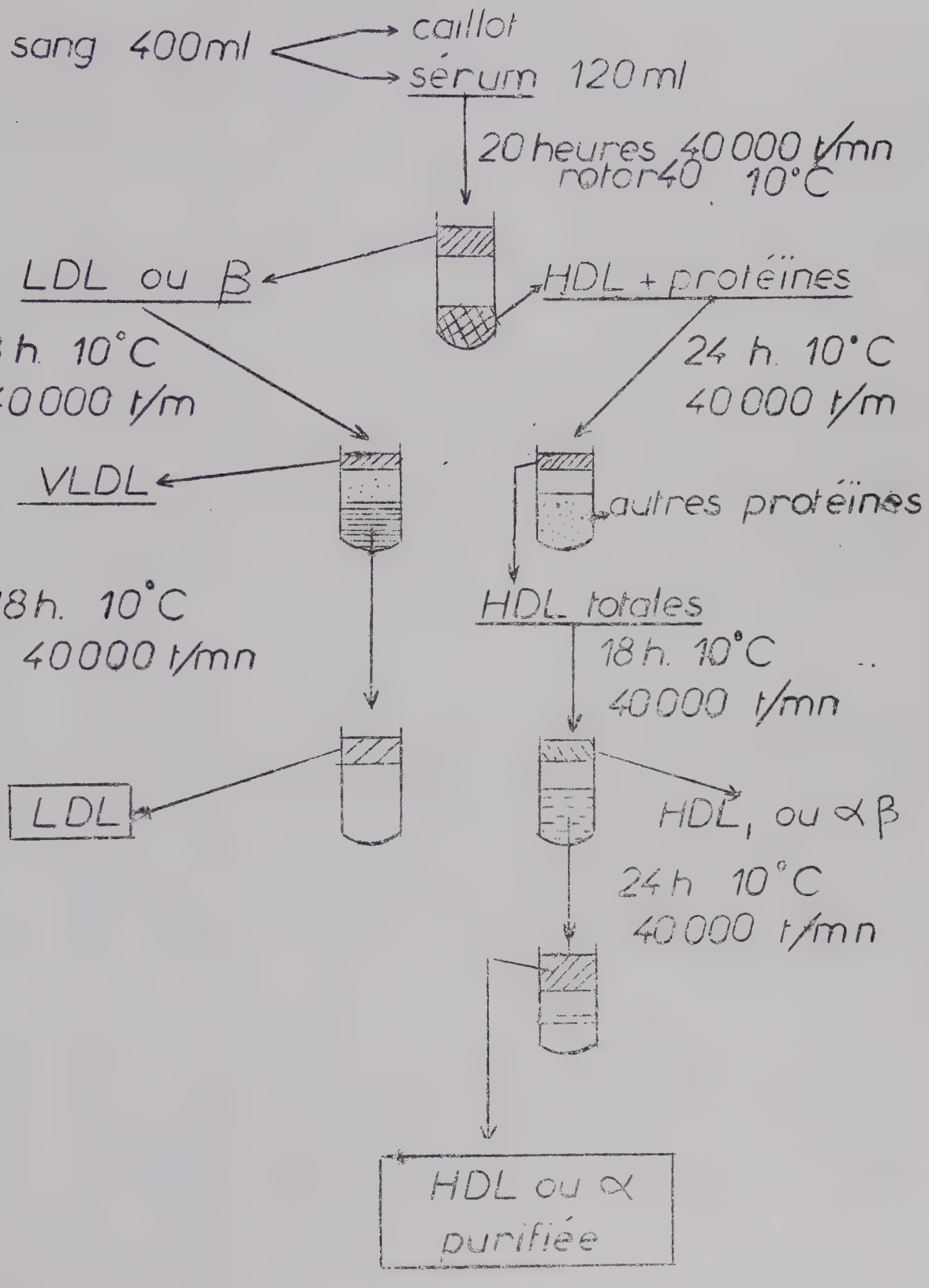
Ces méthodes d'extraction basées sur la précipitation ne permettent pas d'obtenir des préparations pures et rendent les résultats des investigations ultérieures souvent difficilement exploitables.

La méthode de choix est l'ultracentrifugation. Elle permet d'isoler plusieurs classes de lipoprotéines différant par leur densité. Le principe de cette méthode est simple : plusieurs ultracentrifugations sont pratiquées successivement et à chaque fois, la densité du milieu est amenée à une densité intermédiaire à celle des classes de lipoprotéine à séparer afin que l'une plus légère puisse être receuillie à la surface du tube de centrifugation et que les autres plus denses restent au fond du tube.

De Lalla et Goffman (8) ont ainsi isolé en 1954, par ultracentrifugation dans un milieu de densité 1,063, des lipoprotéines légères (LDL) et très légères (VLDL) et, dans un milieu de densité 1,21, des lipoprotéines lourdes (HLD).

Le protocole opératoire que nous avons suivi est le suivant (tableau 1).

.../


sang 400ml
caillot
sérum 120ml
20 heures 40000 t/mn
rotor 40 10°C
LDL ou β
HDL + protéïnes
18 h. 10°C
40000 t/m
24 h. 10°C
40000 t/m
VLDL
autres protéïnes
18h. 10°C
40000 t/mn
HDL totales
18 h. 10°C
40000 t/mn
LDL
HDL, ou αβ
24 h 10°C
40000 t/mn
HDL ou α
purifiée

Après avoir laissé le sang coaguler pendant 24 heures (Ayrault, Jarrier, Polonowski (9), la densité du sérum prélevé est ramenée à 1,063 grâce à une solution de chlorure de sodium et de bromure de potassium.

Après une centrifugation de 20 heures à 10°C avec accélération de 105 000 g (40 000 T/mn, rotor 40, spinco L) on obtient, à la partie supérieure du tube de centrifugation, en un disque jaunâtre, les lipoprotéines légères, une petite zone incolore immédiatement au dessous de celle-ci, contenant très peu de lipoprotéines et, au fond du tube, les lipoprotéines lourdes ainsi que les autres protéines sériques.

Pour isoler et purifier les lipoprotéines lourdes (HDL) on procède à 3 centrifugations successives :

- 1ère centrifugation :

  Après avoir prélevé soigneusement, avec une seringue, le surnageant et la couche incolore, on ajoute, à la partie inférieure du tube, 2,5 grammes de KBr et on ajoute une solution saline de KBr, Na Cl de densité 1,063 jusqu'à atteindre un volume de 11 ml par tube de centrifugation. La densité du milieu étant ainsi ramenée à 1,210, on effectue une centrifugation de 24 heures à 105 000 g (40 000 T/mn, rotor 40, spinco L) qui nous permet de séparer les lipoprotéines de haute densité, qui forment un surnageant jaunâtre et épais, des autres protéines sériques qui se rassemblent au fond du tube.

- 2ème centrifugation :

  Pour débarrasser les lipoprotéines de haute densité des albumines et des globulines qui sédimentent moins bien que les autres protéines dans la solution de densité 1,21, 2 ml de la solution surnageante contenant les HDL totales sont déposés au fond d'un tube d'ultracentrifugation contenant 8 ml d'une solution saline de densité 1,100. Les tubes bouchés sans être mélangés, sont centrifugés pendant 18 heures à 40 000 T/mn. Nous obtenons alors un disque jaune très pâle, une zone intermédiaire incolore et, au-dessous, une zone jaune, contenant les HDL encore contaminées par des protéines légères.

- 3ème centrifugation :

  Elle permet d'obtenir une préparation extrêmement pure. Dans un milieu de densité 1,17, on procède à une centrifugation de 24 heures à 40 000 T/mn et à 10°C toujours. La fraction qui se rassemble à la partie supérieure du tube, en un disque jaune, est une lipoprotéine lourde débarrassée de toutes les autres protéines et lipides du sérum.

.../

Pour isoler les lipoprotéines légères, deux centrifugations sont effectuées à 40 000 T/mn à 10°C.

Le surnageant prélevé à la toute première centrifugation et contenant les lipoprotéines légères totales est ramené à une densité de 1,000 à l'aide d'eau bidistillée et est centrifugé 18 heures. On obtient alors à la surface du tube, un surnageant opalescent contenant les lipoprotéines très légères ou VLDL, immédiatement au-dessous, une zone claire qui les sépare des lipoprotéines légères ou LDL qui sédimentent au fond du tube, sous forme d'un culot jaunâtre.

Après avoir récupéré des VLDL, ce culot de LDL, remis en suspension dans un milieu de densité 1,063, est centrifugé pendant 18 heures. Les LDL qui se rassemblent alors en un surnageant clair, sont pures et débarrassées de tous les lipides du sérum.

Les différentes lipoprotéines que nous avons obtenues sont dialysées contre une solution physiologique de Cl Na afin de les débarrasser du bromure de potassium contenu dans les solutions salines qui ont servi à ajuster la densité du milieu de centrifugation.

Nous avons ajouté de l'EDTA dans le sérum avant toute centrifugation, à raison d'1 mg/ml, dans le liquide de dialyse, à raison de 50 mg/ml, dans le but d'augmenter la stabilité de nos préparations car l'EDTA, en complexant les ions divalents et cuivreux en particulier, évite l'auto-oxydation des acides gras et du cholestérol, responsable de la diminution de solubilité des lipoprotéines (10 et 11).

La flottaison des lipoprotéines peut être suivie par des procédés optiques comparables à ceux utilisés dans la méthode classique d'ultracentrifugation des protéines et on a pu définir de façon analogue une constante de flottaison égale, en valeur absolue, à la constante de sédimentation mais de signe opposé.

On peut ainsi classer les lipoprotéines d'après leur constante de flottaison dans un milieu de densité déterminée, mais cette classification basée sur des critères de densité, malgré qu'elle soit la plus utilisée, est toute relative car, en jouant sur la densité du milieu de centrifugation, on arrive à isoler au sein de chaque classe de lipoprotéines, non seulement différentes sous-classes, mais aussi des fractions intermédiaires où la même protéine peut être associée à différentes quantités de lipides (Scanu et Grada (12).

.../

2 - Constitution chimique et caractéristiques physico-chimiques -

Une fois les différentes classes de lipoprotéines isolées par ultracentrifugation fractionnée, leurs compositions ont été déterminées par différents auteurs.

L'ensemble des compositions, exprimées en pour cent pondéral, est représenté sur le tableau suivant (tableau 2).

	V L D L	L D L	H D L
Protéines	10	25	50
Phospholypides	18	20	25
Triglycérides	57	10	8
Cholestérol	10	8	3
Esters de Cholestérol	5	37	14
Hydrate de Carbone	< 1	~ 1	< 1

- Ainsi, les lipoprotéines de haute densité (d comprise entre 1,200 et 1,063) sont les plus riches en protéines et en phospholipides.

- Parmi les lipoprotéines de faible densité, on peut distinguer celles dont la densité est comprise entre 1,063 et 1,018 qui se caractérisent par leur richesse en cholestérol surtout esterifié.

  D'autres plus légères, de densité comprise entre 1,018 et 1,006, sont moins riches en protéines que les précédentes mais renferment une grande proportion de triglycérides.

.../

Les propriétés physiques sont représentées sur le tableau suivant (tableau 3) :

	sf-1,063	densité	Electro-phorèse sur papier	P M	Taille
H D L		1,063-121	α	200.000	75-100 Å
L D L	0 - 12	1,006-1,063	β	2,1-2,6 10^6	200-220 Å
VLDL	12 - 400	0,95-1,006	pré β	5 - 6 10^6	300-800 Å

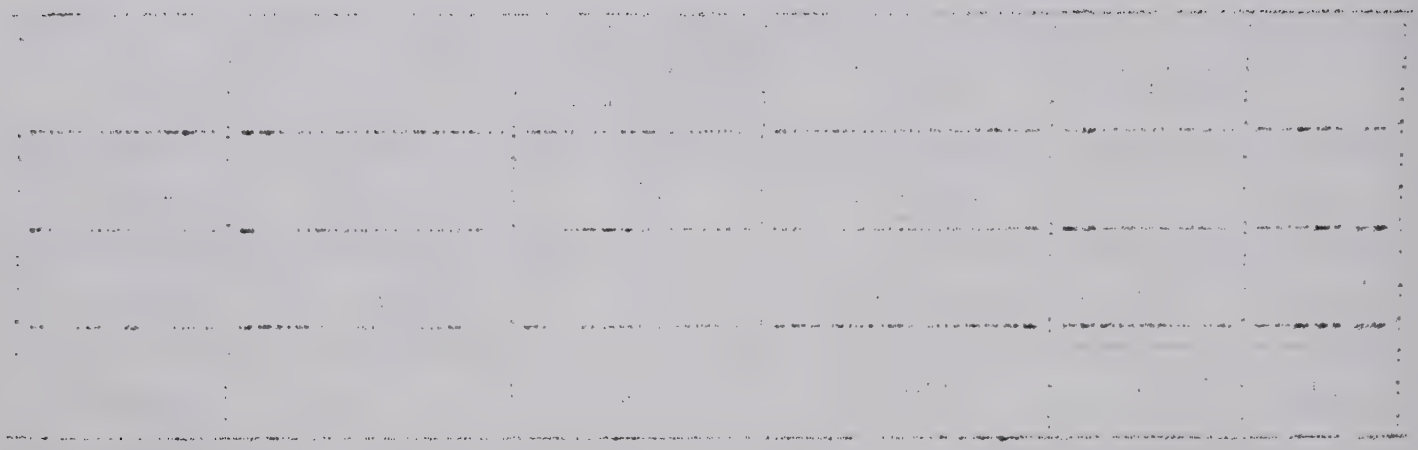
Ainsi, les lipoprotéines, malgré leur propriété commune de dissimuler, dans un environnement aqueux, des lipides très hydrophobes, présentent des différences importantes tant dans leur composition chimique que dans certaines de leurs caractéristiques physiques.

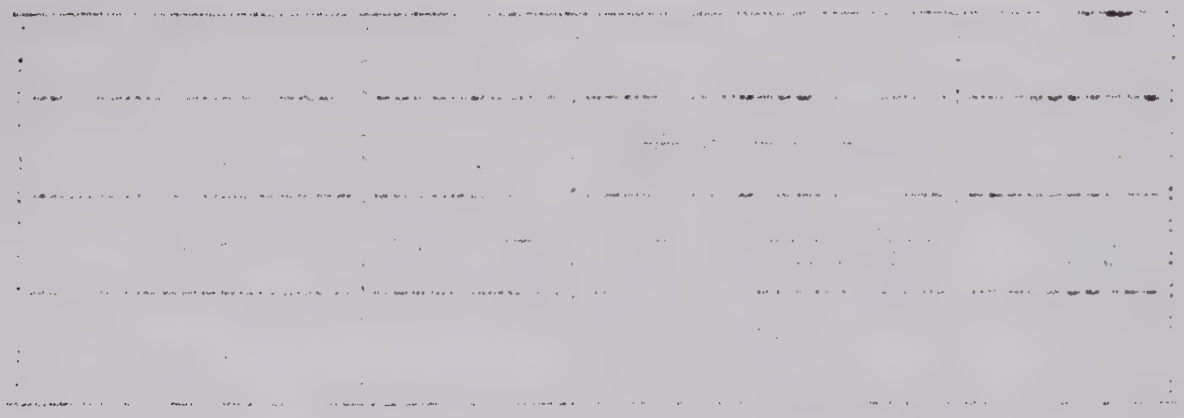
Cependant, il existe une certaine relation entre leur taille et les proportions relatives des constituants insolubles par rapport aux constituants solubles. Si on considère comme insolubles les triglycérides, le cholestérol et ses esters, et comme solubles, les protéines et les phospholipides, on remarque que les diamètres des particules varient proportionnellement aux rapports insolubles/solubles, comme il apparaît dans le tableau suivant (tableau 4).

			Ø en Å
H D L	$\frac{8 + 14 + 3}{25 + 50} = \frac{25}{75}$	0,3	80 - 100
L D L	$\frac{10 + 8 + 37}{20 + 25} = \frac{55}{45}$	$\frac{55}{45} = 1,2$	200 - 220
V L D L	$\frac{72}{28}$	2,6	300 - 800

En effet, le diamètre des particules lipoprotéiques diminue au fur et à mesure qu'augmente la quantité de produits solubles.

.../





Ceci n'est pas sans analogie avec les émulsions où, pour une même quantité totale de lipides insolubles, la dispersion est d'autant plus fine que la quantité relative d'émulsionnant est plus grande. L'explication en est bien connue, les gouttelettes de l'huile de l'émulsion sont recouvertes par l'émulsionnant hydrophile. Plus la quantité d'émulsionnant est grande, plus la surface recouverte sera grande et plus petites seront les gouttelettes.

Un calcul élémentaire montre d'ailleurs que le diamètre moyen des gouttelettes émulsionnées est inversement proportionnel à la quantité relative d'émulsionnant.

A la suite de ces considérations, on pourrait se représenter de façon schématique les lipoprotéines comme étant des particules globulaires où les protéines et les phospholipides en guise d'émulsionnant entourent les lipides non polaires c'est-à-dire les triglycérides, le cholestérol et ses esters.

Pour vérifier ce modèle et afin d'avoir des renseignements sur la disposition relative des constituants dans les particules lipoprotéiques, nous nous sommes proposés de faire subir aux particules une sorte de dissection au moyen d'enzymes spécifiques aux protéines, glycérides et au phospholipides. On doit s'attendre à ce que, suivant la situation d'un constituant à la surface de la particule, il soit plus ou moins accessible à l'action de son enzyme spécifique.

De plus, le constituant le plus superficiel ayant été hydrolysé par son enzyme spécifique, un constituant plus interne pourrait être alors accessible.

Ainsi, on pourrait s'attendre à ce que les effets produits dépendent de l'ordre dans lequel on soumet la particule aux enzymes.

Une fois soumises à l'action des enzymes, les différentes lipoprotéines ont été examinées au microscope électronique afin de mettre en évidence les changements éventuels de structure. Cette partie de notre travail va faire l'objet du chapitre qui suit.

.../

III - ETUDE DE L'ACTION DES ENZYMES AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE

Nous décrirons d'abord, le protocole expérimental de l'attaque enzymatique, ensuite les aspects observés au microscope électronique.

1 - ATTAQUE ENZYMATIQUE -

Camejo (13), en étudiant les compositions chimiques de l'hydrolysat d'une lipoprotéine lourde par la Trypsine a montré que les protéines des H D L sont aussi bien accessibles à la trypsine lorsque les particules sont intactes que si elles ont été préalablement délipidées. Les phospholipides, aussi, sont accessibles et hydrolysées par la phospholipase jusqu'à 95 %.

Nous avons étudié l'hydrolyse de toutes les classes de lipoprotéines (H D L, L D L, V L D L) de façon systématique en faisant agir les enzymes spécifiques des différents constituants, d'abord une à une, ensuite plusieurs à la fois, et en faisant varier l'ordre dans lequel on soumet les particules aux enzymes.

a) - Incubation avec la Pronase -

Les différentes lipoprotéines recueillies par ultracentrifugation sont mises en présence de la pronase (Calbiochem, 45 000 puk/g) dans une solution tamponnée à pH 8, à raison de 200 µg pour 4 mg d'extraits secs de lipoprotéines sous une agitation moyenne. La durée moyenne d'incubation à 37°C a été de 12 heures ; néanmoins, on a pris des échantillons à différents temps d'incubation pour juger de l'action de la Pronase.

b)-Incubation avec la Phospholipase A -

La source de phospholipase A utilisée correspond à la fraction isolée par P. Bocquet (14) à partir du venin de Naja Nigricollis par filtration sur Sephadex 75. Nous avons aussi procédé dans un milieu tampon à pH 8, en ajoutant en plus du chlorure de calcium, à raison de 0,05 molaire, connu comme étant un puissant activateur de la phospholipase.

La durée d'incubation à 37°C était aussi de l'ordre de 12 heures.

c) - Incubation avec la Lipase -

Deux types de lipase ont été utilisés :

.../

une, extraite du champignon Armillaire Rhizopus, a été préparée et décrite par P. Lebourcur et M. Labrousse(15).

L'autre, extraite du Pancréas de porc a été décrite par P. Desnuelles (16).

L'incubation a été effectuée à 37° pendant le même temps en présence de chlorure de calcium.

d) - Incubation avec la Digitonine -

Afin d'explorer le cholestérol et ses esters, dans les lipoprotéines légères surtout, nous avons fait agir la digitonine, connue pour son affinité avec le cholestérol et qui forme un précipité digitonine cholestérol.

c) - Incubation avec plusieurs enzymes différentes -

Dans tous les échantillons où la Pronase a été mise en premier lieu, nous avons fait agir par la suite de l'iniprol dans une proportion vingt fois plus grande que la pronase ; celle-ci étant alors inhibée, nous avons ajouté, dans les mêmes proportions que précédemment, la lipase ou la phospholipase selon les cas.

2 - MICROSCOPIE ELECTRONIQUE -

Les échantillons lipoprotéiques, ainsi hydrolysés, ont été observés au microscope électronique afin de déceler les modifications morphologiques susceptibles d'être produites par l'attaque enzymatique.

A - Technique -

C'est la technique des colorations négatives qui a été utilisée. La grille est d'abord déposée sur l'échantillon lipoprotéique pendant trente secondes, puis desséchée sur papier buvard. Ensuite, elle est mise en contact avec la goutte de colorant pendant des temps variables, allant de quelques secondes à une minute, dans le but d'obtenir des images de contraste optimal. Le colorant le plus utilisé a été l'acide phosphotungstique à 4 %. Toutefois, des essais ont été faits avec d'autres produits, l'acétate d'uranyle en particulier.

Les microphotographies ont été obtenues avec un microscope électronique SIEMENS Elbmiskop 101. Des grossissements variables de 20 000 à 80 000 ont été utilisés alors que l'aggrandissement photographique a été de 4 et de 5.

Quelques mesures ont été effectuées directement sur les photographies afin de déterminer le diamètre moyen des particules.

Parmi toutes les microphotographies obtenues, nous n'avons retenu que lesplus significatives.

B - Résultats -

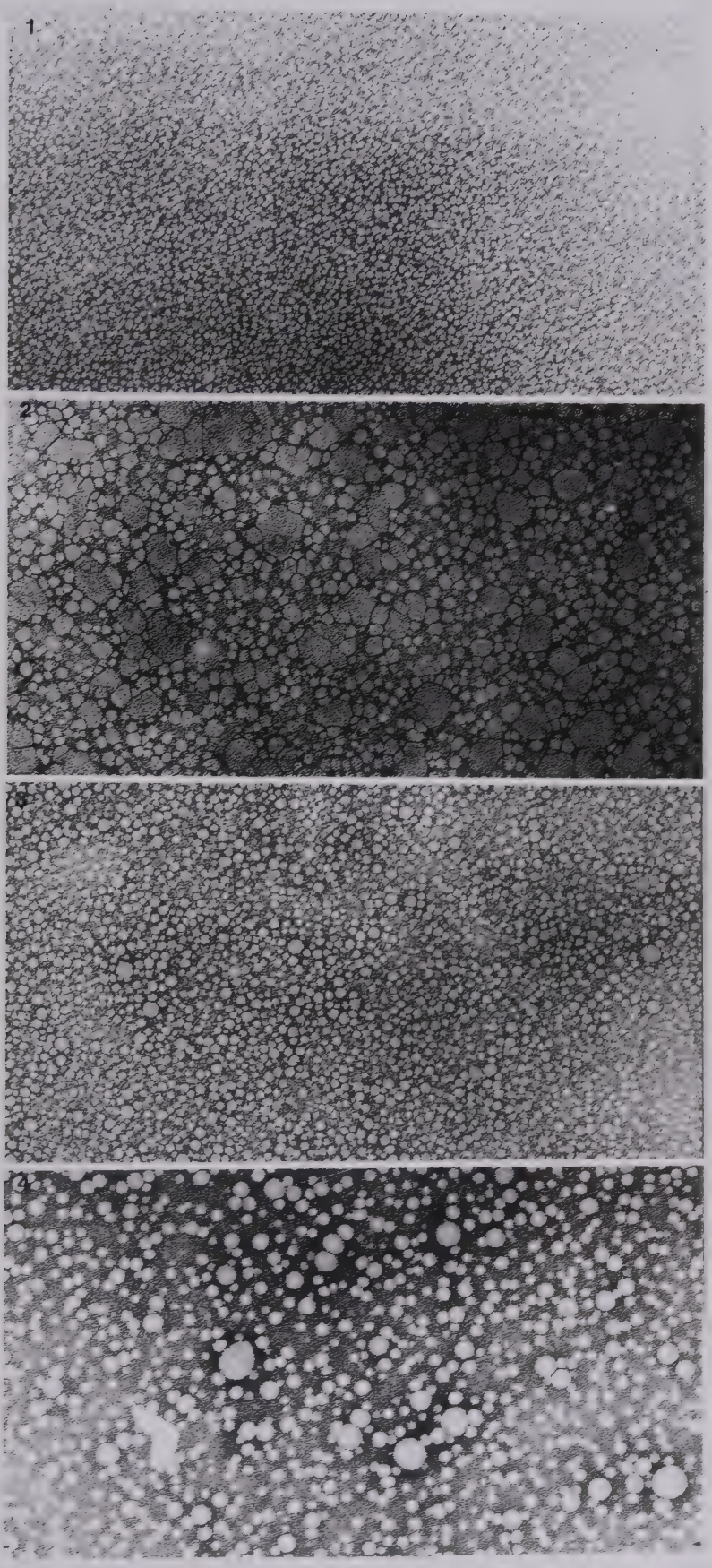
a) Les Lipoprotéines lourdes -

La figure (1) représente une microphotographie des lipoprotéines lourdes, avant tout traitement enzymatique, telles qu'elles ont été observées au microscope électronique après coloration négative à l'acide phosphotungstique (grossissement final de 200 000). Les particules lipoprotéiques apparaissent comme des images globulaires transparentes aux électrons, avec une région centrale dense aux électrons, le tout noyé dans une matrice très dense d'acide phosphotungstique.

Le diamètre moyen des particules, tel que nous l'avons déterminé, est d'environ 90 Å, ce qui est conforme aux résultats de nombreux auteurs et de Forte (17) en particulier. On a observé sur certains clichés que les particules s'agrègent pour former de gros amas ; mais pour des préparations de dilution convenable, elles restent séparées les unes des autres et gardent leur individualité morphologique. La présence de régions très denses aux électrons, au centre des particules, a conduit certains auteurs (17) à penser que chaque particule est constituée de deux à quatre sous unités lipoprotéiques, suivant des arrangements variables, en grain de café, en rosace, ou en trèfle. En ce qui nous concerne, nous pensons qu'il s'agit beaucoup plus d'artefacts techniques, liés à la taille de l'émulsion microphotographique.

La figure (2) représente des lipoprotéines lourdes après action de la Pronase. L'aspect général des particules est totalement différent de celui de la figure (1), et ceci n'est pas surprenant si l'on se rappelle que la moitié des constituants des H D L, qui est protéique, a été hydrolysée. Les différences de taille entre les particules traduisent le dégré d'avancement de la réaction enzymatique. Les plus grandes images transparentes aux électrons sont pour la plupart polygonales, comme si elles subissaient des contraintes de la part des particules voisines. Elles représentent certainement une coalescence de plusieurs particules après rupture des chaînes protéiques. Malgré cela, ces différentes grosses particules gardent une certaine individualité morphologique dûe probablement à l'intégrité des phospholipides et à la présence de quelques restes de chaînes peptidiques, fortement hydrophiles.

.../


1
2
3
4

L'aspect observé sur la figure (2) suggère donc que les protéines jouent un grand rôle dans la stabilité des lipoprotéines lourdes et qu'elles sont directement et facilement accessibles à l'action de la pronase. Les protéines seraient donc disposées à la surface de la particule lipoprotéique avec les groupes polaires dirigés vers l'extérieur alors que les chaînes hydrocarbonées paraffiniques seraient dirigées vers l'intérieur.

L'action de la phospholipase seule ou conjointe à celle de la lipase n'entraîne que peu de modifications morphologiques si ce n'est une augmentation de la taille des particules (figure 3). Ceci suggère que les produits de la réaction, acides gras et lysophosphatides, restent au sein même de la particule et ne s'en détachent pas. Les forces de liaisons entre protéines et lipides et entre lipides seraient du type forces de London-Van Der Walls ou forces hydrophobes, et ne seraient pas beaucoup modifiées.

La lipase, à elle seule, n'entraîne aucune modification de la structure des particules ; ce qui suggère que les triglycérides sont inaccessibles à l'hydrolyse enzymatique lorsque la particule est intacte et que leurs trois fonctions esters, même si elles se trouvaient à la surface de la particule, seraient complètement masquées par l'environnement protéique et phospholipidique.

Les effets les plus importants sont observés lorsqu'on fait agir sur la lipoprotéine la pronase dans un premier temps, la phospholipase ensuite. L'aspect observé est alors celui de particules sphériques, d'allure et de structure totalement différentes de celles observées auparavant, évoquant fortement l'aspect de gouttelettes d'huile (figure 4). Les substances les plus hydrophiles, c'est-à-dire les protéines et les phospholipides, étant hydrolysées, les lipides insolubles c'est-à-dire, les triglycérides, le cholestérol et ses esters, restent alors sous forme de gouttes qui ont tendance à fusionner entre elles, comme le montrent certaines régions de la figure (3).

Cette étude au microscope électronique de l'hydrolyse enzymatique des lipoprotéines nous a montré que le phénomène le plus fréquemment observé était l'augmentation de la taille des particules, chaque fois qu'étaient hydrolysées les protéines et les phospholipides. Ceci suggère donc que ces constituants fortement polaires se comportent bien comme les "émulsionnants" des autres constituants insolubles (glycérides, cholestérol et ses esters). Tout se passe comme si les lipoprotéines lourdes étaient des particules globulaires avec une coque protéo-phospholipidique et un coeur non polaire de cholestérol et de glycérides.

.../

Les microphotographies que nous avons obtenues ne sont pas en faveur de structure particulaire en sous-unités comme l'ont décrit Forte (17), Levy et Frédérikson (18).

L'accessibilité très facile des protéines à l'enzyme spécifique et l'importante augmentation de taille qui en résulte, suggère que les chaînes peptidiques de la protéine sont dans une conformation plutôt compacte ; ce qui est en accord avec les résultats obtenus par Scanu (18-19) en dispersion optique rotatoire et en dichroïsme circulaire. Quant aux triglycérides et cholestérol, si leurs parties paraffiniques sont certainement dirigées vers l'intérieur de la particule, incorporées dans un certain arrangement moléculaire, avec les chaînes hydrocarbonées de la lécithine, à l'image d'une émulsion de cholestérol, lécithine, sels biliaires, il n'est pas exclu que les liaisons esters et que les groupements OH soient à la surface de la molécule, tout en étant inaccessibles à l'action de la lipase.

b) - Les lipoprotéines légères -

La figure (5) représente les LDL avant tout traitement enzymatique et après une coloration négative à l'acide phosphotungstique. Les images transparentes aux électrons ont un contour polygonal. Cette forme nous a semblé d'abord être dûe à une sorte de contrainte qui apparaît lorsque les particules, dans une solution concentrée, sont au contact les unes des autres. Il n'en est rien puisque pour des préparations, de dilution très importante, les particules conservent toujours cette forme. Cependant, un tel aspect pourrait être dû à l'interaction des colorants avec la lipoprotéine et il ne faudrait pas exclure la possibilité pour les particules d'avoir une forme sphérique ou globulaire lorsqu'elles sont in-vivo dans le sérum.

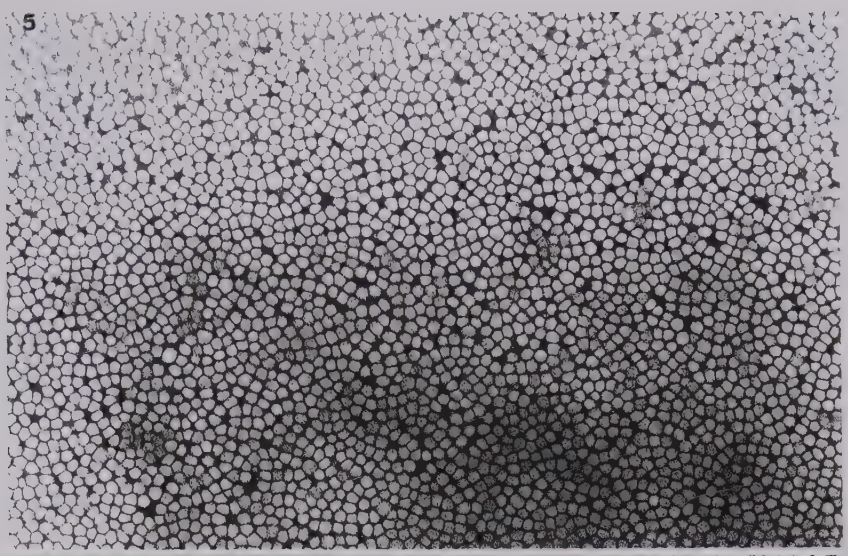
Soulignons aussi la régularité des espaces interparticulaires de l'ordre d'une quinzaine d' Å.

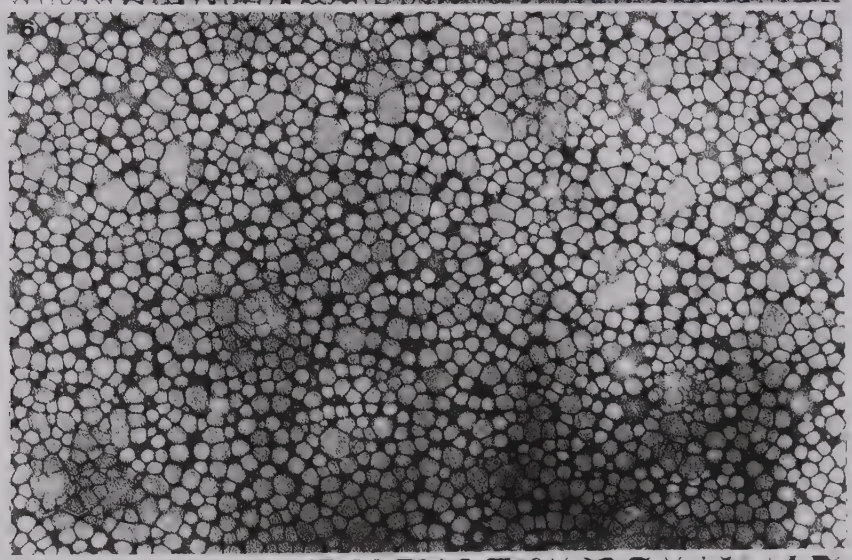
Le diamètre que nous avons mesuré est de l'ordre de 200 Å, ce qui est compatible avec les résultats de nombreux auteurs (Forte (17), Lindgren et Nichols (21)).

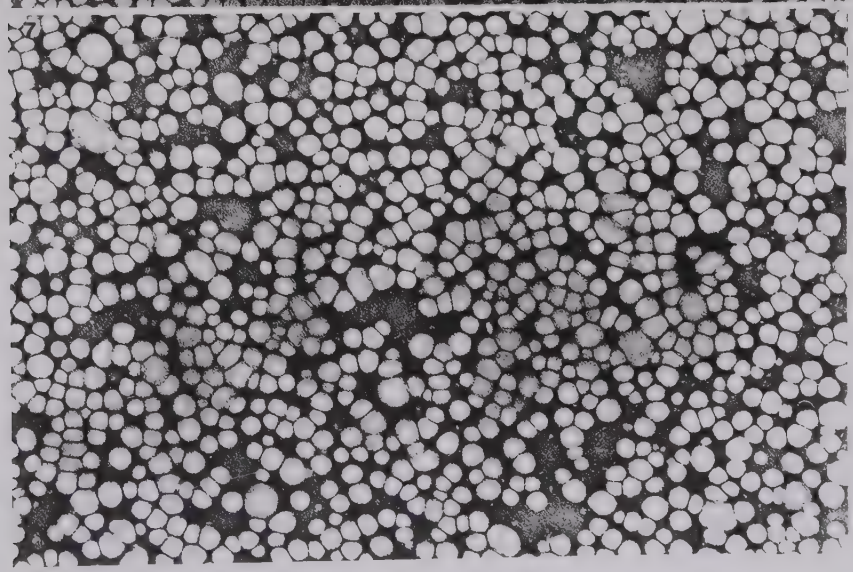
L'action de la pronase entraîne moins de modifications que dans le cas des lipoprotéines lourdes (figure 6). Il existe une nette augmentation de taille des particules avec apparition de sortes de flaques mal délimitées correspondant probablement à des amas de lipides insolubles.

Les protéines facilement accessibles à la pronase seraient donc à la surface de la particule.

.../


5


6


7

L'action de la phospholipase, entraîne, elle aussi, une augmentation de la taille des particules mais sans aucune modification morphologique. Ce qui suggère que, dans ce cas aussi, les phospholipides sont à la surface de la particule et jouent, eux aussi, le rôle d'"émulsionnant" ; mais les produits de la réaction, acide gras et lysophosphatides, resteraient au sein même de la particule.

Un fait important est l'absence de tout changement lorsqu'on fait agir la lipase et la digitonine. Ceci souligne l'inaccessibilité des triglycérides et du cholestérol qui constituent donc le "coeur" de la particule.

Enfin, la pronase et la phospholipase utilisées successivement produisent une augmentation de la taille des particules très importante (figure 7) montrant une fois de plus que la protéine et les phospholipides interviennent dans la structure de la particule comme les "émulsionnants" des lipides non polaires triglycérides, cholestérol et ses esters. Mais, un calcul simple montre que la protéine, même complètement étirée, n'arriverait pas à recouvrir toute la surface de la particule lipoprotéique.

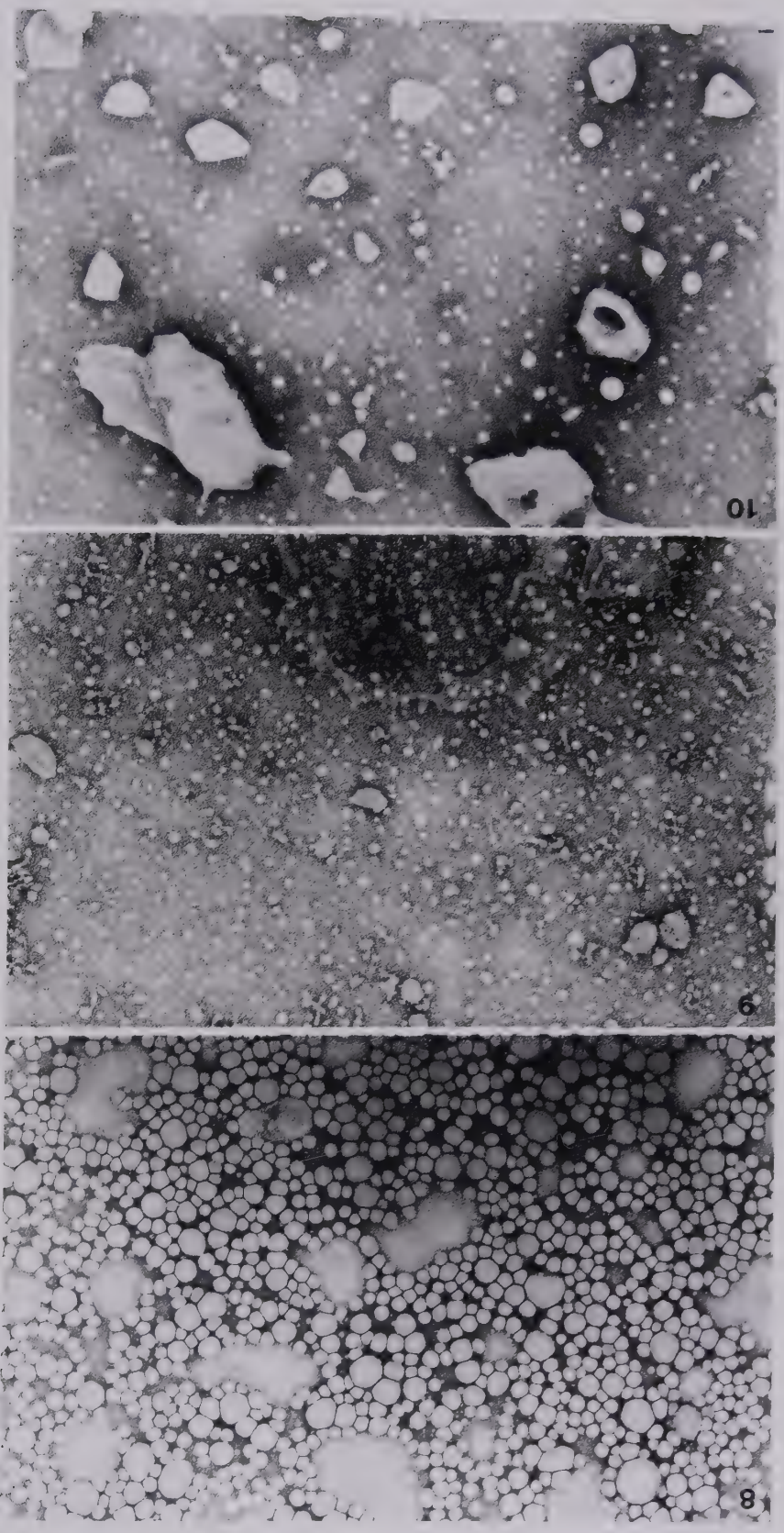
Une structure superficiellement organisée avec des molécules globulaires de protéines disposées régulièrement et reliées entre elles par les phospholipides ne serait donc pas incompatible avec ces faits. Les triglycérides et le cholestérol seraient inclus dans les phospholipides. Mais les microphotographies obtenues ne pouvaient nous permettre de mettre en évidence une telle structure avec des sous-unités. Ceci dépassant la limite du pouvoir de résolution de l'appareil.

c)-<u>Les lipoprotéines très légères</u> -

La figure 8 montre les VLDL avant toute attaque enzymatique. Elles sont de taille et de forme variables, mais l'aspect sphérique est celui qui est le plus souvent rencontré. Leur forte transparence aux électrons est certainement liée à leur forte teneur en triglycérides et leur pauvreté en protéines. La présence de flaques de lipides sans limite nette, traduit leur détérioration, au moment de la coloration et du dessèchement, dûe à leur fragilité. L'allure générale est celle d'une émulsion banale (huile-gomme arabique par exemple).

Remarquons que l'action la plus significative, à la différence des deux autres classes de lipoprotéines, est celle de la lipase (figure 9). Les particules, après la lipolyse deviennent très petites, plus denses aux électrons et de même transparence que les HDL.

.../


10
6
8

Ces modifications morphologiques traduisent l'accessibilité directe des triglycérides à la lipase.

La phospholipase n'entraîne pratiquement pas de modification de structure de la particule, ce qui est lié probablement à leur teneur relativement faible en phospholipides par rapport aux triglycérides.

Après attaque par la pronase puis par la lipase, il n'existe plus aucune structure si ce n'est de grosses flaques d'huile (figure 10).

Ainsi que l'on s'y attendait, ces particules, pauvres en constituants polaires, sont peu stables.

Les constituants polaires (protéines et phospholipides) ne peuvent former qu'une couche très mince à la surface des particules. Ceci expliquerait l'accessibilité très facile des triglycérides à la lipase comme c'est le cas avec les émulsions artificielles de triglycérides obtenues avec la gomme arabique comme agent émulsionnant.

IV - ETUDE D'UN MODELE DE MELANGE LIPIDIQUE PAR LA TECHNIQUE DES COUCHES MONOMOLECULAIRES

Afin de pouvoir interpréter les modalités d'action des enzymes lipolytiques sur les lipoprotéines sériques, véritable mosaïque de molécules lipidiques diverses, nous avons entrepris, dans une deuxième partie de notre travail, de faire agir ces enzymes sur un modèle constitué d'un mélange de lipides. Ce modèle est constitué par une couche monomoléculaire mixte.

Cette façon de procéder nous a permis d'apprécier dans quelle mesure l'action d'une lipase ou d'une phospholipase sur son substrat peut être influencée lorsque le substrat se trouve mélangé à d'autres substances comme c'est le cas des lipoprotéines.

Cela revient, en somme, à étudier l'accessibilité d'un triglycéride ou d'une lécithine à son enzyme spécifique lorsque le substrat, au lieu d'être seul, fait partie d'un mélange comme c'est le plus souvent le cas des situations biologiques.

Auparavant, il faut souligner la particularité de la réaction enzyme-substrat lorsque celui-ci est lipidique. Cette réaction, étant donné l'insolubilité des lipides dans l'eau, ne peut avoir lieu en phase homogène, mais à l'interface huile-eau.

Aussi, il nous paraît important de rappeler certaines propriétés que possèdent les lipides à l'interface eau-air.

Ces composés lipidiques (lécithine, glycérides) sont des substances amphiphiles, c'est-à-dire que leurs molécules possèdent deux parties de comportement physicochimique totalement opposées : une polaire hydrophile et une paraffinique lipophile.

Suivant l'importance respective de chacune de ces deux parties dans les différents composés, ceux-ci seront plus ou moins liposolubles ou hydrosolubles. C'est ce que traduit la notion de balance hydrophile lipophile. Cette notion apparaît clairement lorsqu'on envisage la solubilité dans l'eau de ces différents corps. Par exemple : les triglycérides saturés qui ont comme partie polaire 3 fonctions esters et comme partie hydrophobe 3 chaînes hydrocarbonées, sont pratiquement insolubles dès que les acides gras ont plus de 6 atomes de carbone ; les diglycérides saturés avec 1 chaîne paraffinique en moins et une fonction OH en plus sont insolubles à partir de 8 atomes de carbone. A l'opposé, les savons ou les lysocithines avec une seule chaîne d'acides gras et un groupe ionisé sont solubles dans l'eau.

.../

Entre ces deux extrêmes, les lécithines, avec le groupe hydrophile phosphoryl-choline et deux chaînes hydrocarbonées, ne se dissolvent pas mais peuvent incorporer jusqu'à 43 % d'eau.

Tous ces composés amphiphiles s'orientent sur une surface aqueuse et s'étalent pour former une couche à une seule assise de molécules. Pour cela, il suffit de déposer à la surface de l'eau des quantités de substances suffisamment petites par rapport à la surface (0,1 mg/m2 au maximum) Mais la couche monomoléculaire n'est stable que si le lipide est totalement insoluble.

Un substrat lipidique ainsi étalé en couche monomoléculaire à la surface de l'eau peut être rassemblé ou détendu en faisant varier à volonté l'aire totale disponible. La couche monomoléculaire de substrat peut ainsi être soumise à l'attaque de l'enzyme dissoute dans l'eau sous-jacente dans des conditions différentes de sa densité superficielle.

L'addition au substrat dans différentes proportions d'autres substances susceptibles aussi de s'étaler et de s'orienter à la surface de l'eau mais qui sont insensibles à l'action de l'enzyme considéré permet de se rendre compte de l'influence de ces molécules étrangères sur la cinétique de la réaction. L'action d'une enzyme sur une couche monomoléculaire de lipides a été étudiée par différents auteurs (Hugues (22), Davidson et Bangham (23), etc..... (24 25).

1) - Technique et mode opératoire -

Nous avons utilisé la méthode décrite par Dervichian (26), basée principalement sur le choix d'un substrat tel que tous les produits de la réaction sont solubles dans l'eau et quittent par conséquent la surface au fur et à mesure qu'avance la réaction. La cinétique de la lipolyse peut donc être suivie simplement en mesurant la diminution de l'aire de la couche en fonction du temps.

Remarquons par ailleurs, que les produits de la réaction ne peuvent inhiber l'action de l'enzyme car leur concentration effective est négligeable. En effet, la quantité totale de substrat étalé est de l'ordre de 30 microgrammes alors que le volume de l'eau sous-jacente est de deux litres soit 15γ/l. Et même si, du fait de la lenteur de la diffusion on considère que les produits de la réaction restent dans une épaisseur d'un 1/10 mm au-dessous de la couche, la concentration ne sera que de 5γ/ml, ce qui est encore négligeable.

Le lipide est déposé à la surface de l'eau sous forme d'une solution dans un mélange d'éther de pétrole et de benzène. Le solvant s'évapore rapidement et laisse la couche de molécules de lipides orientés.

.../

Nous avons donc utilisé comme glycéride, soumis à l'action de la lipase, la dicaprine et comme phospholipide, soumis à l'action de la phospholipase, la dinonanoyl lécithine. Comme produits additifs, nous avons utilisé dans le premier cas la lécithine du jaune d'oeuf, particulièrement purifié, et dans le deuxième cas, la trilaurine, également très pure.

La dinonanoyl lécithine (PM 532) nous a été fournie par le laboratoire de biochimie d'Utrecht.

La dicaprine utilisée (PM 400) est un produit de synthèse des laboratoires Astra de Paris.

Pour obtenir des mélanges lipidiques dans différentes proportions, on procède de la façon suivante. Des solutions mères de concentrations connues de chacun des constituants dans le mélange d'éther de pétrole et de benzène sont d'abord préparées. Il suffit ensuite d'ajouter l'un à l'autre des volumes différents de ces solutions mères pour obtenir des mélanges lipidiques dans toutes les proportions voulues.

C'est ainsi que deux séries de dix échantillons de chacun des mélanges suivants ont été préparés :

- Dicaprine + ovolécithine pour l'étude de la lipase
- Dinonanoyl lécithine + trilaurine pour l'étude de la phospholipase.

L'appareil utilisé a été décrit précédemment par Dervichian (26). Il constitue une modification de la cuve de "Langmuir" adaptée à ces études de cinétique enzymatique. Un exemple d'étude a été donné également dans un article d'Olive et Dervichian (27).

Une fois la cuve remplie du tampon approprié, et le dispositif de mesure étant mis en place, la couche est étalée après avoir préalablement bien essuyé la surface de l'eau.

La couche est ensuite comprimée jusqu'à atteindre la densité superficielle choisie à laquelle se fait l'expérience. Une quantité connue de l'enzyme préalablement dissous dans environ 150 ml de la même solution de tampon que celui qui sert de support à la couche,est ensuite rapidement injectée dans l'eau. La diffusion de l'enzyme étant très lente, un dispositif de brassage est utilisé pour homogénéiser l'ensemble de la solution.

.../

Le début de l'hydrolyse est immédiatement mis en évidence par la chute de la pression superficielle qu'exerce la couche sur un dispositif de mesure. Ceci nécessite la compression de la couche pour maintenir la pression superficielle constante, ce qui revient à maintenir la densité superficielle constante. La diminution de la surface, par suite de la compression, mesure directement la quantité de substrat disparu.

2) - Définition de la vitesse de réaction -

La vitesse de réaction est définie comme la fraction de substrat qui disparaît par unité de temps.

Si m est la quantité totale de substrat, et $\frac{dm}{dt}$ la quantité qui disparaît par unité de temps, la vitesse V est donnée par la relation :

$$V = -\frac{1}{m}\frac{dm}{dt} = -\frac{1}{dt}\frac{dm}{m}$$

A toute pression superficielle constante, l'aire S de la couche est proportionnelle à la quantité de substance étalée et la variation dS de cette aire, par suite de la lipolyse est aussi proportionnelle à dm ;

On peut aussi écrire :

$$V = -\frac{1}{Jt} \cdot \frac{dS}{S}$$

Ce qui peut s'écrire aussi :

$$V = -\frac{d \text{ Log } S}{dt}$$

Il suffit ainsi de tracer une courbe donnant la variation du Log S en fonction du temps et de prendre la pente de cette courbe pour obtenir la vitesse -(Dervichian (26).

3) - Cas des couches mixtes -

Mais, dans le cas présent, où la couche est mixte, formée du substrat et d'une substance inerte vis à vis de l'enzyme, la diminution de la surface au cours du temps n'est dûe qu'à l'hydrolyse des seules molécules du substrat. La diminution apparente dépend donc de l'importance de la proportion de substrat. Il faut donc tenir compte de la fraction

.../

molaire du substrat dans le mélange et connaître les valeurs des aires moléculaires respectives de chacun des constituants. Plus exactement, il faut considérer l'aire moléculaire partielle apparente $\bar{a}$ qui est fonction de la composition du mélange. Cette grandeur $\bar{a}$ peut être déterminée en établissant dans une étude physico chimique préliminaire, la courbe de variation de l'aire moléculaire A en fonction de la fraction molaire f.

Ceci conduit à adopter, pour obtenir la vitesse d'hydrolyse du substrat dans un mélange où sa fraction molaire est de f, la relation suivante :

$$V = -\frac{1}{dt} \cdot \frac{dS}{S} \cdot \frac{A}{\bar{a} f}$$

ou encore,

$$V = -\frac{d \text{ Log } S}{dt} \cdot \frac{A}{\bar{a} f}$$

D'autre,part, à mesure que la réaction se poursuit et que le substrat disparaît, la composition de la couche change forcément et ne correspond plus à la fraction molaire connue f du départ. Il est donc nécessaire de ne considérer que la vitesse du début de la réaction.

4) - Résultats -

Toutes les attaques enzymatiques en couche superficielle ont été effectuées à la pression superficielle de 15 dynes/cm, et à une température moyenne de 20 °C. Les vitesses des cinétiques enzymatiques, calculées, comme il a été dit plus haut, sont portées en fonction de la fraction molaire de la substance additive dans le mélange.

La figure 11 est relative à l'attaque par la lipase de la dicaprine additionnée de quantités différentes de lécithine. Elle indique la variation de la vitesse d'hydrolyse en fonction de la fraction molaire en lécithine. On s'aperçoit que la vitesse augmente jusqu'à atteindre un maximum puis diminue jusqu'à s'annuler lorsque la fraction molaire en lécithine est de 0,55.

Dès l'incorporation de quelques molécules de lécithine dans le glycéride la réaction enzymatique commence à être exaltée, la vitesse étant plus grande que si la dicaprine était seule. Un maximum de vitesse est atteint pour une proportion de 1 molécule de lécithine pour 4 de glycéride. Puis, au fur et à mesure qu'augmente la fraction molaire de lécithine, la vitesse décroit progressivement. Elle

.../

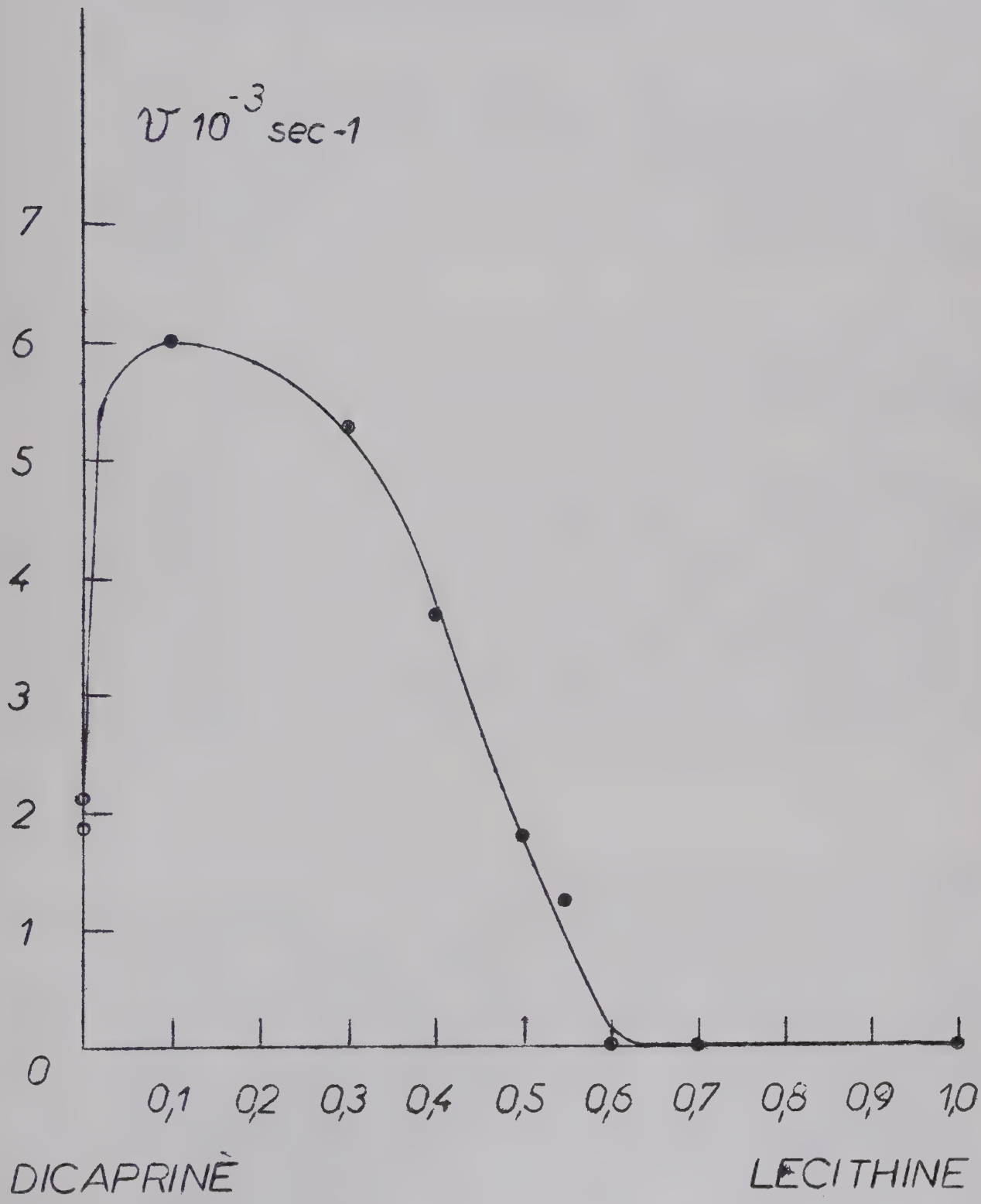

$\upsilon\ 10^{-3}$ sec-1
7
6
5
4
3
2
1
0
0,1
0,2
0,3
0,4
0,5
0,6
0,7
0,8
0,9
1,0
DICAPRINÈ
LECITHINE

fig. n°11

s'annule dès que l'on atteint la proportion de 2 molécules de lécithine pour 3 de dicaprine, toute action cessant au dessus de cette proportion.

Ce résultat frappant indique, de toute évidence, le rôle déterminant des molécules étrangères qui entourent la molécule du substrat sur l'action de l'enzyme spécifique.

De la même façon, la figure 12 est relative à l'action de la phospholipase sur une lécithine lorsque celle-ci est additionnée de quantités différentes de trilaurine. Elle indique la variation de la vitesse d'hydrolyse en fonction de la fraction molaire en trilaurine. Une exaltation est observée, ici aussi, dès l'incorporation de quelques molécules de trilaurine au milieu des molécules de substrat. Le maximum de vitesse correspond à 1 molécule de trilaurine pour 4 de lécithine.

La vitesse décroit ensuite et toute action cesse au-dessus de la proportion de 2 molécules de trilaurine pour 3 de lécithine. Encore une fois, apparaît une sorte d'inhibition de la réaction spécifique dès que le nombre des molécules du substrat dans le mélange se trouve inférieur à 60%.

Dans quelle mesure le maximum d'exaltation et l'arrêt de l'action enzymatique peuvent-ils être expliqués par des considérations purement physico-chimiques ? On peut affirmer que la concentration particulière de 60 %, où la vitesse d'hydrolyse s'annule, correspond à une modification de la structure moléculaire de la couche. Ceci a été mis en évidence par toute une étude purement physico-chimique, menée d'une façon parallèle, sur les isothermes Pression - Aire moléculaire des différents mélanges dont la discussion sort du cadre de cet exposé. Cependant, nous ne pouvons pas encore expliquer le changement de la vitesse de réaction par ce changement de la structure de la couche.

5) - Conclusions -

Il ressort de cette étude faite sur les couches monomoléculaires mixtes, en tant que modèles, que l'arrêt de l'hydrolyse d'un substrat impliqué dans un mélange ne signifie nullement que tout le substrat est épuisé. En l'occurence, nous avons montré, dans les deux cas particuliers de mélanges binaires, que la réaction d'hydrolyse s'arrête alors qu'il y a encore 60 % de substrat dans le mélange. Dans le cas des mélanges plus complexes que sont les lipoprotéines, on doit s'attendre à des comportements encore plus complexes. C'est donc à la lumière de ces remarques qu'il faut examiner les résultats que nous avons rapportés dans le chapitre III sur l'examen par microscopie électronique des lipoprotéines ayant subi l'action de différents enzymes. Il ne faudra pas non plus les perdre de vue dans le chapitre V qui suit et qui est relatif aux mesures potentiométriques de ces actions enzymatiques.

.../

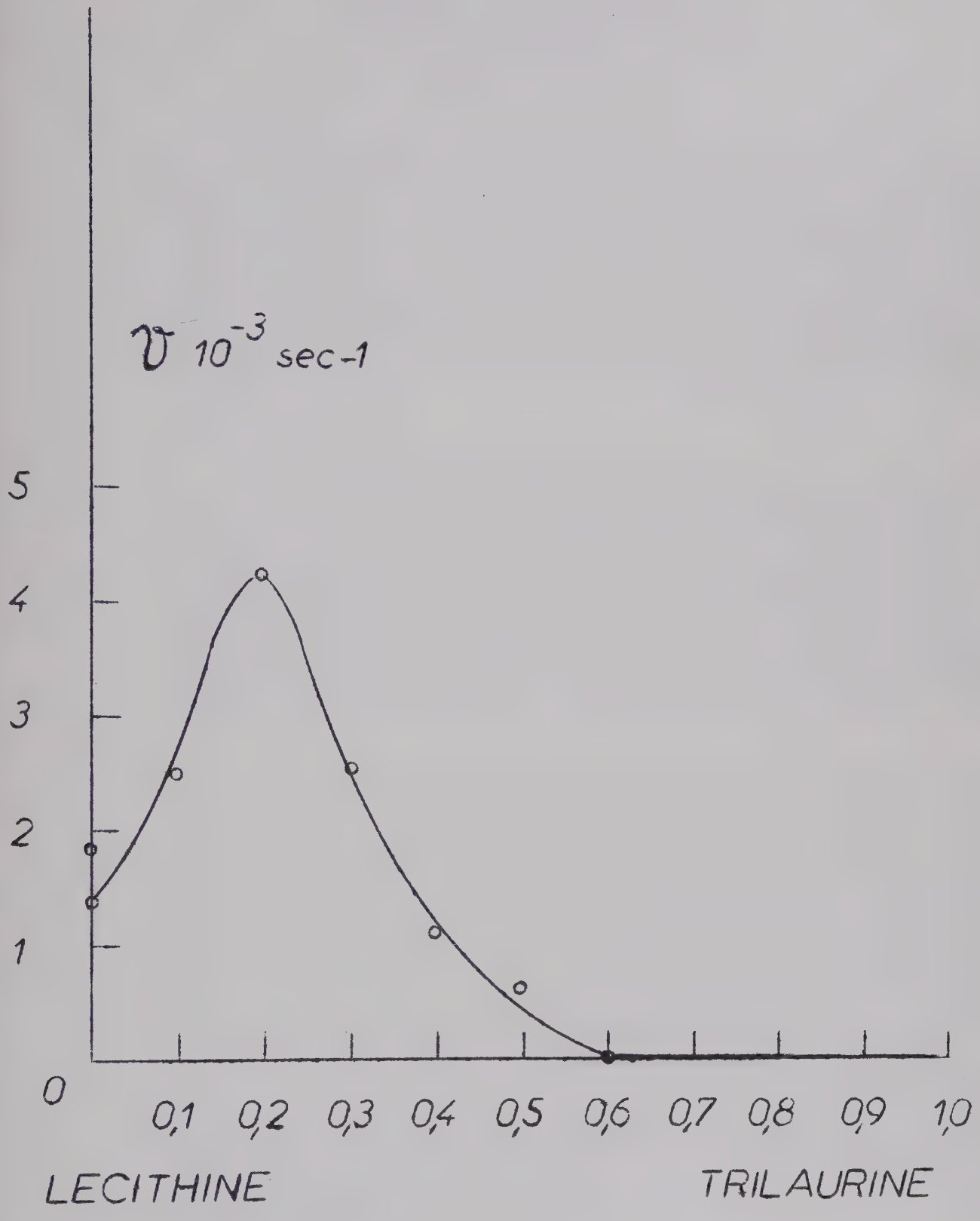

$v\ 10^{-3}$ sec-1
5
4
3
2
1
0
0,1
0,2
0,3
0,4
0,5
0,6
0,7
0,8
0,9
1,0
LECITHINE
TRILAURINE

fig. n°12

V - ETUDE POTENTIOMETRIQUE DE L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE DES LIPOPROTEINES

Afin de s'assurer que les modifications morphologiques observées au microscope électronique sont bien dûes à l'attaque des lipoprotéines par les différentes enzymes, nous avons fait quelques essais de mesures potentiométriques de la dégradation enzymatique des lipoprotéines. La cinétique enzymatique est alors suivie par titrage continu des acides gras libérés au fur et à mesure que sont hydrolysés les triglycérides lorsqu'il s'agit de l'action de la lipase ou que sont hydrolysés les phospholipides, dans le cas de la phospholipase.

1) - Technique et mode opératoire -

Toutes les mesures ont été effectuées à l'aide d'un pH stat Radiometer.La préparation de lipoprotéines, contenue dans une cuve sous une atmosphère d'azote dépourvue de gaz carbonique, est d'abord ramenée à la valeur du pH choisi pour l'expérience, par l'addition d'une solution de soude. L'enzyme est ensuite ajoutée à l'aide d'une microseringue. La libération d'acide gras dûe à l'hydrolyse enzymatique est alors enregistrée au moyen de l'appareil réglé au pH choisi et délivrant automatiquement une soude 0,02 normale.

La vitesse de réaction exprimée en micromoles de soude par minute se déduit directement de la pente de la droite inscrite par l'appareil. Mais, pour que ces droites donnent une mesure exacte de la vitesse de réaction, il faut que cette vitesse soit inférieure à la capacité de réponse du pH stat et à la vitesse de titrage des acides. Le premier point est vérifié dès que l'appareil ne délivre pas continuellement de la soude. Pour vérifier le second point, il faut que l'appareil débite de la soude à vitesse maximum et s'arrête brusquement dès que l'équivalent de soude est introduit. On est ainsi certain que la pente de la droite inscrite par l'appareil donne la vitesse de réaction d'hydrolyse.

Nous avons utilisé les mêmes enzymes que dans le chapitre III. Remarquons toutefois qu'il ne nous a pas été possible de suivre la cinétique de l'hydrolyse des lipoprotéines par la pronase, étant donné le caractère amphotère des peptides libérés, nous nous sommes alors contentés d'une simple incubation à 37°, comme précédemment, en ce qui concerne la pronase.

.../

2)-Les résultats -

De la même façon que dans le chapitre III, les différentes lipoprotéines ont été hydrolysées par les enzymes spécifiques de leur constituant, d'abord un à un, puis plusieurs à la fois et dans un ordre différent.

- Action de la phospholipase -

C'est avec les lipoprotéines lourdes que les vitesses enzymatiques ont été les plus importantes. Il n'apparaît toutefois aucune modification de leur solubilité au cours de la réaction. La vitesse de l'hydrolyse n'est pas modifiée lorsque la lipoprotéine a été préalablement hydrolysée par la pronase.

Pour les lipoprotéines légères et très légères, la cinétique enzymatique est moins importante et n'est pas, elle aussi, influencée par l'action préalable de la pronase.

Ces résultats nous indiquent une fois de plus que les phospholipides qui sont directement hydrolysés par la phospholipase, seraient à la surface de la particule lipoprotéique. D'autre part, les liaisons entre protéines et phospholipides, même lorsqu'elles sont modifiées après l'action de la pronase, n'interviennent pas au cours de l'hydrolyse des phospolipides par la phospholipase.

- Action de la lipase -

Un fait très important, est l'action de la lipase sur les lipoprotéines lourdes et légères, suivant que celles-ci sont intactes ou modifiées par l'action préalable de la pronase.

En effet, lorsque la lipase est ajoutée, seule, aux HDL ou L.D.L., nous obtenons un enregistrement plat traduisant l'absence de réaction lipolytique alors que les triglycérides existent dans la particule lipoprotéique. Mais, s'il y a eu auparavant hydrolyse par la pronase, la réaction de lipolyse a lieu avec une vitesse assez importante. Tout se passe donc comme si la rupture de la protéine entraînait un "démasquage" des triglycérides qui deviennent alors accessibles à la lipase. Ceci suggère fortement que les triglycérides sont profondément enfouis au coeur de la particule lipoprotéique. Mais il faut se rappeler les résultats obtenus avec les modèles de mélanges binaires de lipides du chapitre IV où la réaction de l'enzyme avec son substrat est fortement influencée par la composition du mélange. Ainsi, les triglycérides pourraient très bien se trouver à la surface mais ne pas être attaqués par la lipase parce qu'ils sont mélangés dans des proportions défavorables.

.../

En ce qui concerne les lipoprotéines très légères, soulignons l'action de la lipase qui s'effectue directement avec une cinétique se rapprochant beaucoup de celle des émulsions artificielles faites avec de l'huile et de la gomme arabique. Cette cinétique n'est absolument pas influencée par un traitement préalable des V L D L par la pronase et la phospholipase. Ce fait est fortement en faveur d'une structure type émulsion où les triglycérides et le cholestérol sont entourés d'une fine couche de protéines et de phospholipides.

.../

VI - CONCLUSIONS

Nous avons vu qu'à côté des constituants hydrophiles que sont les protéines et les phospholipides, les lipoprotéines contenaient des triglycérides et des esters de cholestérol, particulièrement hydrophobes. Si dans les lipoprotéines lourdes (H.D.L.), les constituants hydrophiles représentent 75 % de la composition, cette proportion n'est plus que de 45 % dans les lipoprotéines légères (L.D.L.) et inférieure à 30 % dans les lipoprotéines très légères (VLDL).

Tout au cours de ce travail, il a été question de la façon dont ces différents constituants des lipoprotéines pouvaient être organisés dans la particule afin d'assurer la solubilité dans le milieu aqueux qu'est le sérum.

Or, déjà pour les protéines ordinaires, où l'on peut distinguer des séquences d'acides aminés hydrophobes et des séquences d'acides aminés hydrophiles, l'idée prévaut de plus en plus que,dans la molécule, la conformation est telle que les séquences hydrophobes sont à l'intérieur et les séquences hydrophiles à l'extérieur. A plus forte raison, dans le cas des lipoprotéines formées, non pas d'une seule molécule, mais de plusieurs constituants, les uns nettement hydrophiles, à savoir les protéines et les phospholipides, les autres délibérément hydrophobes, à savoir les triglycérides, le cholestérol et ses esters, il est difficile de ne pas considérer que les premiers de ces constituants doivent avoir tendance à se disposer dans la partie extérieure au contact du milieu aqueux qui les baigne et les autres, d'avantage à l'intérieur.

C'est sur cette base qu'a été entrepris et poursuivi le présent travail dans lequel l'accent a été sans cesse mis sur la destruction entre constituants hydrophiles et constituants lipophyles.

Nous avons montré d'ailleurs, dans le tableau 4, qu'à l'image des émulsions pour lesquelles la taille des gouttelettes diminue lorsque la proportion de l'émulsionnant ajouté à l'huile augmente, la taille des particules des lipoprotéines de différentes classes est d'autant plus petite que la proportion des constituants hydrophiles est plus grande. D'où une première indication préalable que ces constituants hydrophiles, comme l'émulsionnant dans les émulsions, se trouvent à la surface des particules. Mais, d'autres arguments plus expérimentaux sont nécessaires pour le prouver.

Nous avons vu, par microscopie électronique,que les lipoprotéines lourdes augmentaient de taille chaque fois que, sous l'action d'une protéase ou de la phospholipase, la protéine ou les phospholipides étaient hydrolysés. Par contre, la lipase n'entraînait aucune modification morphologique.

.../

Ceci est bien en faveur d'un modèle de particules dont la surface serait constituée aussi bien par les groupes polaires des protéines que par ceux des phospholipides, en contact avec le milieu circulant, et dont le noyau représente toutes les parties non polaires constituées aussi bien des chaînes hydrocarbonées des triglycérides et des phospholipides du cholestérol, que des régions hydrophobes des protéines. Ce seraient les forces de London et de Van De Walls qui joueraient le rôle principal dans la stabilité de la particule.

Les modifications morphologiques des lipoprotéines légères (LDL) observées par microscopie électronique, et en particulier l'apparition de flaques de lipides, après leur attaque par la pronase et la phospholipase semblent montrer aussi le rôle d'émulsionnant joué par la protéine et les phospholipides vis à vis des lipides non polaires, c'est-à-dire les triglycérides, le cholestérol et surtout les esters de celui-ci.

Mais, étant donné la proportion relativement faible du constituant protéique par rapport à la taille de la particule, une structure superficiellement organisée avec des molécules globulaires de protéine, disposées régulièrement et reliées entre elles par les phospholipides, paraît acceptable. Cependant, la limite du pouvoir de résolution de l'appareil ne pouvait pas permettre de mettre en évidence de telles sous-unités.

En ce qui concerne les lipoprotéines très légères (VLDL), les microphotographies ont mis en évidence un fait important, à savoir les grandes modifications subies par les particules lorsqu'elles sont soumises à l'hydrolyse par la lipase, ceci les différenciant complètement des deux autres classes de lipoprotéines. La très facile accessibilité des triglycérides à leur enzyme spécifique est nettement en faveur de l'hypothèse d'une structure très proche d'une véritable émulsion, où la mince couche protéo-phospholipidique serait disposée à la surface, entourant un gros noyau hydrophobe de triglycérides et de cholestérol. La pauvreté relative de ces lipoprotéines VLDL en "agents émulsionnants" expliquerait alors leur peu de stabilité, comme en témoigne la grande variabilité de la taille de leur particule.

Afin de mieux interpréter les observations faites par microscopie électronique surtout en ce qui concerne les modalités d'action des enzymes lipolytiques, étant donné que la situation dans une lipoprotéine sérique est celle d'un mélange complexe de molécules lipidiques, il est apparu nécessaire d'entreprendre une étude parallèle sur des modèles simples de mélanges binaires de lipides. Comment se fait l'hydrolyse d'un glycéride par la lipase lorsque le glycéride n'est pas seul, mais est additionné de lécithine, comment se fait l'hydrolyse de la lécithine par la phospholipase lorsqu'elle est additionnée de glycérides ? La technique des couches monomoléculaires s'est révélée idéale pour cette étude et nous a fourni une réponse inattendue.

.../

Alors que, dans les deux cas, l'addition d'une quantité faible de substance étrangère au substrat éxalte d'abord la réaction enzymatique spécifique, toute attaque cesse dès que la concentration du substrat dans le mélange est inférieure à 60 %. Ce fait expérimental frappant indique de toute évidence le rôle déterminant des molécules étrangères qui entourent la molécule de substrat en ce qui concerne son hydrolyse par son enzyme spécifique.

Ainsi, la modification de la composition d'un mélange lipidique, par suite de l'hydrolyse partielle d'un des composants par son enzyme, peut déclencher l'attaque d'un autre composant jusque là protégé contre son enzyme spécifique.

Ceci d'ailleurs a été suggéré lorsqu'au cours de mesures potentiométriques de la dégradation enzymatique des lipoprotéines, un fait important est apparu : le comportement des différents enzymes vis à vis des constituants de la lipoprotéine varie selon l'ordre dans lequel les enzymes sont ajoutés à la préparation lipoprotéique.

Aussi bien l'étude par microscopie électronique des modifications morphologiques provoquées par les différents enzymes que l'étude par titrage potentiométrique des différents lipides, nous ont apporté des renseignements utiles sur la structure possible des lipoprotéines. Mais, l'étude parallèle des modèles de mélanges lipidiques nous a montré avec quelles précautions il fallait interpréter les résultats. Comment, dans un milieu complexe, un composant pouvait être protégé contre l'action de son enzyme spécifique même s'il est géométriquement accessible.

BIBLIOGRAPHIE

1 - Macheboeuf M.A. 1929 Bull. Soc. Chimie Biol.11 268 293

2 - Cohn and E J. Al 1950 J. Amchem Soc. 72 465-474

3 - Oncley Gurd Melin 1950 J. Am Chem Socie. 72 458-464

4 - Oncley Gurd 1953 Tullis JL ed. Blood Cells and Pl Proteins Acad. Press N Y 337-357

5 - Bernfeld P. 55 Fedn. Proc. Am Soc. exp. biol. 25,764

6 - Burnstein et Samaille 55 Cr hebd. Seance Acad. Sciences Paris 241, 664-665

7 - Burnstein 57 J. Physio Paris 49, 83-86

8 - Gofman J W, De Lalla O. 54 Meth. Biochem Analysis Ed Glick N Y 1954 V 1

9 - Ayrault - Jarrier, Levy, Wald Polonowski 1963 Bull Soc. Chimie Biol. 45 n° 4 349-359

10- Oncley J.L. et Gurd FRN Blood Cells and Plasma Proteins their state in nature J.L. Tullis Ed. 337-357 Acad. Press N Y and Lon.

11- Nishida et Kummerow 1960 J. Lipid Res. 1 450-458

12- Scanu et Granda 1966 Biochemistry NY 5 466

13- Camejo BBA 1969, 175, 290

14- Bocquet et Coll. Ann. Inst. Pasteur 1967, 112, 213

15- P. Laboureur et M. Labrousse Bull. Soc. Chim. Biol. 1966, 48, 747

16- Marchis - Mouren, Sarda et Desnuelle, Arch. Biochem. Biophys. 1959, 83, 309

17- Forte et Coll. Chemistry and Physic of lipids, 1968, 2

18- Levy et Frederikson, J. Clin. Investi. 1965, 44, 426

19- Scanu Proc. Natl Acad. Sci. US 1968,59, 890

.../

20 - Scanu Proc. Natl Acad. Scie. US 1965, 54, 1699

21 - Lindgren et Nichols "In the plasma protein" Ed. F.Puteman Acad. Press NY 1960, 2, 1

22 - Hugues A. Biochem J. 1935, 29, 437

23 - Dawson, Bangham Biochem J. 1959, 72, 493

24 - Zografi, Verger, De Haas Chem. Phys. 1971, 7, 185

25 - Garner and Smith, Biochem Biophys. Acta 1970, 39, 672

26 - Dervichian D.G. Biochimie 1971, 53, 25-33

27 - Olive et Dervichian Biochimie 1971, 53, 207